รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. ชุดโครงการวิจัย : **มาตรการสุขอนามัยพืช**

2. โครงการวิจัย : **การศึกษาชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับพืชนำเข้า**

กิจกรรม : **ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับพืชและส่วนของพืชเพื่อขยายพันธุ์**

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : **การตรวจหาไฟโตพลาสมาในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้า**

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : **Detection of Phytoplasma in Imported Tomato Seed**

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : วาสนา รุ่งสว่าง สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : ปรียพรรณ พงศาพิชณ์ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

: วันเพ็ญ ศรีชาติ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

: วานิช คำพานิช สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

: โสภา มีอำนาจ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

: กาญจนา วาระวิชะนี สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ : มะเขือเทศเป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในประเทศไทย ในแต่ละปีมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก ศัตรูพืชหลายชนิดมีความสามารถในการติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศได้ ทั้งเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไวรอยด์สาเหตุโรคพืช รวมไปถึงไฟโตพลาสมาที่มีงานวิจัยชี้ให้เห็นถึงความสามารถในการติดไปกับเมล็ดมะเขือเทศของไฟโตพลาสมา ประเทศไทยจึงถือได้ว่ามีความเสี่ยงที่อาจมีไฟโตพลาสมาติดเข้ากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศด้วย เพราะในแต่ละปีมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พ่อแม่พันธุ์และเมล็ดพันธุ์การค้าเป็นจำนวนมากจากหลากหลายประเทศ ดังนั้น งานวิจัยในครั้งนี้จึงทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีการนำเข้าจากต่างประเทศในช่วงปี 2562-2563 รวมทั้งสิ้นจำนวน 43 รายการ นำเข้าจาก 9 ประเทศ ได้แก่ ฟิลิปปินส์ อินเดีย จีน ฮ่องกง อเมริกา เนเธอร์แลนด์ ฝรั่งเศส เกาหลีใต้ และอิสราเอล นำเมล็ดพันธุ์ไปทำการเพาะกล้า สกัดสารพันธุกรรมชนิดดีเอ็นเอจากตัวอย่างต้นกล้ามะเขือเทศ ตรวจสอบไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ P1/P7 สำหรับการทำพีซีอาร์รอบที่หนึ่ง และคู่ไพรเมอร์ R16F2n/R16R2 สำหรับการทำพีซีอาร์รอบที่สอง จากนั้นจึงตรวจสอบแถบแบนของดีเอ็นเอภายหลังการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส ผลการตรวจสอบพบว่าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศทั้ง 43 รายการ นำเข้าจากทั้ง 9 ประเทศดังกล่าวนั้น ไม่พบไฟโตพลาสมาติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ

กรมวิชาการเกษตร

: The tomatoes are one of the most important crops in Thailand. Each year a large number of tomato seeds are imported from abroad. Many pests are capable of infecting tomato seeds including fungi, bacteria, viruses and viroids. Including phytoplasma, showed the ability to attach to tomato seeds of phytoplasma. Thailand is therefore considered to be at risk of having phytoplasma attached to tomato seeds. Because each year there are many amount of parent seeds and commercial seeds from various countries. So this research, sampling the imported tomato seeds from 2019-2020. Total of samples are 43 shipments were import from 9 countries including the Philippines, India, China, Hong Kong, America, Netherlands, France, South Korea and Israel. Growing the seeds for extraction from tomato seedlings. Phytoplasma was tested by the nested PCR technique using the first-stage PCR by the primers pair of P1 / P7, using the second-stage PCR by the primers pair of R16F2n / R16R2. After that bring the PCR product to the gel electrophoresis method. This study showed that the all of 43 tomato seeds were imported from all 9 countries are free from Phytoplasma.

6. คำนำ : ไฟโตพลาสมาเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชชนิดหนึ่งที่สามารถเข้าทำลายและก่อโรคกับพืชได้มากกว่า 300 ชนิด โดยในประเทศไทยโรคพืชที่เกิดจากไฟโตพลาสมาในพืชเศษฐกิจที่สำคัญของไทย ได้แก่ โรคใบขาวในอ้อย และโรคพุ่มแจ้ในมันสำปะหลัง เป็นต้น ทั้งนี้ในต่างประเทศยังมีรายงานพบไฟโตพลาสมาเข้าทำลายและก่อโรคในมะเขือเทศได้ด้วย ซึ่งในประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงานการพบไฟโตพลาสมาเข้าทำลายและก่อโรคในมะเขือเทศ ในแต่ละปีมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก เพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ทางการค้าและใช้ผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเพื่อการส่งออกซึ่งประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศส่งออกที่สำคัญแห่งหนึ่ง ในปี ค.ศ. 2011 มีการศึกษาและรายงานการตรวจพบไฟโตพลาสมาในต้นกล้ามะเขือเทศ ซึ่งบ่งชี้ถึงการมีความสามรถในการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดของไฟโตพลาสมาสาเหตุโรค การที่ประเทศไทยนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเป็นจำนวนมากในทุกๆ ปีถือเป็นความเสี่ยงในการที่จะมีไฟโตพลาสมาติดต่างถิ่นติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์ ปัจจุบันมีการแพร่ระบาดของศัตรูพืชที่สำคัญหลายชนิดในต่างประเทศ บางชนิดเป็นศัตรูพืชที่ยังไม่มีรายงานพบในประเทศไทย หากศัตรูพืชร้ายแรงแพร่ระบาดเข้ามาในประเทศไทย นากจากจะทำความเสียหายกับพืชเศษฐกิจที่สำคัญของประเทศแล้วยังก่อให้เกิดผลกระทบกับการส่งออกสินค้าเกษตรไปยังต่างประเทศด้วย จึงควรทำการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีการนำเข้า เพื่อตรวจหาไฟโตพลาสมาที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์เหล่านั้น และเพื่อเป็นการ

กรมวิชาการเกษตร

ป้องกันการเข้ามาเพิ่มปริมาณ แพร่ระบาด และตั้งรกรากของศัตรูพืชชนิดนี้ในประเทศไทยด้วย ดังนั้น งานวิจัยในครั้งนี้จึงทำการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาที่อาจติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีการนำเข้าจากต่างประเทศ และทำการจำแนกชนิดของศัตรูพืชด้วยเทคนิคด้านชีวโมเลกุล เพื่อให้ทราบชนิดของศัตรูพืชตลอดจนแหล่งที่มา การปรากฏของศัตรูพืชในประเทศคู่ค้าและเส้นทางการเข้ามาของศัตรูพืช และเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงทางวิชาการสำหรับการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชให้เหมาะสมรัดกุมและป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชกักกันเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศไทย

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ
2. วัสดุวิทยาศาสตร์ ประกอบด้วย
   - หลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
   - ทิปดูดสารละลาย ขนาด 10 ไมโครลิตร
   - ทิปดูดสารละลาย ขนาด 200 ไมโครลิตร
   - ทิปดูดสารละลาย ขนาด 1 มิลลิลิตร
   - โกร่งบดตัวอย่าง
3. สารเคมี ประกอบด้วย
   - สารละลาย General Extraction Buffer (GEB)
   - ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (FavorPrep™ Plant Genomic DNA Extraction Kit)
   - ชุดเอนไซม์สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermo Scientific™ DreamTaq Green PCR Master Mix)
   - สารละลายไพรเมอร์ที่จำเพาะ
   - ผงอะกาโรส (agarose gel)
   - สารย้อมสีดีเอ็นเอ (RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution)
   - สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน (Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder)
4. วัสดุสำนักงาน ประกอบด้วย
   - ถุงพลาสติก
   - กระดาษกรอก
   - ปากกามาร์กเกอร์

กรมวิชาการเกษตร

5. อุปกรณ์และเครื่องมือ ประกอบด้วย

- เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Digital scale, METTLER TOLEDO)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (MIKRO 120 centrifuge, Hettich®)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, memmert)
- ตู้แช่แข็ง -30 องศาเซลเซียส (freezer, SANYO)
- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA thermocycler, eppendorf)
- เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis, BIO-RAD)
- เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation, BIO-RAD)

- วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับไฟโตพลาสมาที่มีรายงานการเข้าทำลายในมะเขือเทศทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ รวมทั้งข้อมูลในเรื่องของวิธีการตรวจสอบด้วยเชื้อไฟโตพลาสมาโดยใช้เทคนิคด้านชีวโมเลกุล

2. การเตรียมตัวอย่าง

สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีการนำเข้าจากต่างประเทศตามมาตรฐาน International Seed Testing Association (ISTA, 2019) ทำการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยตาเปล่า และบันทึกข้อมูล จากนั้นทำการเพาะเมล็ดบนกระดาษกรองเป็นเวลา 7-10 วัน หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างต้นกล้ามะเขือเทศในแต่ละตัวอย่างจำนวน 200 ต้น แบ่งเป็น 50 ต้นต่อตัวอย่างย่อย จากนั้นจึงนำไปสกัดดีเอ็นเอ (total DNA)

3. การสกัดดีเอ็นเอ (total DNA)

3.1 นำตัวอย่างต้นกล้ามะเขือเทศที่เตรียมไว้ไปชั่งน้ำหนัก แล้วเติมสารละลาย GEB ที่อัตราส่วน 1:5 (W/V) บดให้ละเอียด จากนั้นนำน้ำคั้นปริมาตร 400 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดไมโครทิวป์ แล้วเติมสารละลาย FAPG1 (ที่เติม RNase A เรียบร้อยแล้ว) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน (vortex mix)

3.2 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และกลับหลอดทุกๆ 10 นาที เมื่อครบเวลาจึงนำมาเติมสารละลาย FAPG2 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน (vortex mix) แล้วบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

3.3 เตรียม Filter Column แล้วเทสารในข้อ 3.2 ลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที แล้วดูดของเหลวส่วนบน (supernatant) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ใส่ลงในไมโครทิวป์หลอดใหม่ เติมสารละลาย FAPG3 ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอด

3.4 เตรียม FAPG Column แล้วเทสารในข้อ 3.3 ลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และทิ้งของเหลวใต้คอลัมน์

กรมวิชาการเกษตร

3.5 เติมสารละลาย W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และทิ้งของเหลวใต้คอลัมน์

3.6 เติมสารละลาย W2 ปริมาตร 650 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และทิ้งของเหลวใต้คอลัมน์ (ทำซ้ำอีกครั้ง)

3.7 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นย้ายคอลัมน์ด้านในวางลงในหลอดไมโครทิวป์ เติมสารละลาย Elution (ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสรอไว้แล้ว) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บริเวณกึ่งกลางเมมเบรน (membrane) ภายในคอลัมน์ และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที

3.8 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ของเหลวที่ได้คือสารละลายดีเอ็นเอ (total DNA) นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปดำเนินการตรวจสอบด้วยเทคนิค Nested PCR

4. การตรวจหาไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested PCR

นำสารละลายดีเอ็นเอ (total DNA) ของมะเขือเทศที่สกัดไว้มาตรวจหาไฟโพลาสมาด้วยเทคนิค nested PCR (ISPM 27, 2016) โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ **(ตารางที่ 1)** ดำเนินการดังนี้

4.1 การทำพีซีอาร์ครั้งที่ 1 (first-stage PCR)

เตรียมสารองค์ประกอบในการดำเนินปฏิกิริยาที่ปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร ดังนี้

น้ำ (nuclease-free water)	ปริมาตร 6 ไมโครลิตร
สารละลาย 2X DreamTaq Green Master Mix	ปริมาตร 10 ไมโครลิตร
สารละลายไพรเมอร์ P1 (ความเข้มข้น 10 uM)	ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
สารละลายไพรเมอร์ P7 (ความเข้มข้น 10 uM)	ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอต้นแบบ (total DNA)	ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

เมื่อเตรียมสารองค์ประกอบเรียบร้อยแล้ว นำไปเพิ่มปริมาณชิ้นยีนเป้าหมายโดยกำหนดโปรแกรมการทำงานสำหรับคู่ไพรเมอร์ P1 / P7 ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 pre-denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซสเซียส	เป็นเวลา 3 นาที
ขั้นตอนที่ 2 denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 3 annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 60 วินาที
ขั้นตอนที่ 4 extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 90 วินาที

โดยกำหนดให้ขั้นตอนที่ 2-4 ทำซ้ำ 35 รอบ

ขั้นตอนที่ 5 post-extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที

กรมวิชาการเกษตร

เมื่อการทำงานเสร็จเรียบร้อยแล้วจึงนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR product) มาเจือจางด้วยน้ำ (nuclease-free water) ที่อัตราส่วน 1:50 (v/v) (**1st-PCR product**) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำพีซีอาร์ครั้งที่ 2 (second-stage PCR) ต่อไป

4.2 การทำพีซีอาร์ครั้งที่ 2 (second-stage PCR)

เตรียมสารองค์ประกอบในการดำเนินปฏิกิริยาที่ปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร ดังนี้

น้ำ (nuclease-free water)	ปริมาตร 6 ไมโครลิตร
สารละลาย 2X DreamTaq Green Master Mix	ปริมาตร 10 ไมโครลิตร
สารละลายไพรเมอร์ R16F2n (ความเข้มข้น 10 uM)	ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
สารละลายไพรเมอร์ R16R2 (ความเข้มข้น 10 uM)	ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอต้นแบบ (**1st-PCR product**)	ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

เมื่อเตรียมสารองค์ประกอบเรียบร้อยแล้ว นำไปเพิ่มปริมาณชิ้นยีนเป้าหมายโดยกำหนดโปรแกรมการทำงานสำหรับคู่ไพรเมอร์ R16F2n / R16R2 ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 pre-denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 3 นาที
ขั้นตอนที่ 2 denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 3 annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 60 วินาที
ขั้นตอนที่ 4 extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 90 วินาที
โดยกำหนดให้ขั้นตอนที่ 2-4 ทำซ้ำ 35 รอบ		
ขั้นตอนที่ 5 post-extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที

4.3 เมื่อสิ้นสุดการดำเนินปฏิกิริยา นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR product) มาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็คโตโฟรีซีส (gel electrophoresis) ดังนี้

4.3.1 เตรียม 1.5% อะกาโรลเจล โดยชั่งผงอะกาโรส 1.5 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยการให้ความร้อน จากนั้นผสมสารย้อมสีดีเอ็นเอ (RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution) ลงในสารละลายเจลก่อนการเทเจล

4.3.2 นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในเจลที่เตรียมไว้และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA ladder เป็นตัวเทียบในเจลด้วย จากนั้นให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 35-45 นาที

4.3.3 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation บันทึกภาพแล้วนำไปวิเคราะห์ผล และส่งตัวอย่างวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

4.3.4 นำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับในฐานข้อมูลของ GenBank

กรมวิชาการเกษตร

5. หากตรวจพบไฟโตพลาสมาจะนำไปทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังขั้นตอนต่อไปนี้

5.1 เพิ่มปริมาตรดีเอ็นเอสำหรับการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ตรวจพบไฟโตพลาสมาให้ได้ความเข้มข้นและปริมาณเพียงพอสำหรับการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นส่งผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอดังกล่าวให้กับบริษัท Macrogen เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบส

5.2 วิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับเบส โดยนำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มาทำการจัดการข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปออนไลน์และโปรแกรม DNASTAR จากนั้นศึกษาความสัมพันธ์และเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGA-X

- เวลาและสถานที่

เดือนตุลาคม 2561 - กันยายน 2563 ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าไฟโตพลาสมาเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชชนิดหนึ่ง สามารถเข้าทำลายและก่อโรคกับพืชได้มากกว่า 300 ชนิด เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถแยกเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และเป็นเชื้อที่อ่อนแอต่อสารปฏิชีวนะเตตราซัยคลินแต่ต้านทานต่อเพนนิซิลลิน การเจริญของเชื้อไฟโตพลาสมาภายในต้นพืชจะอยู่เฉพาะภายในเซลล์ท่ออาหาร (phloem) บริเวณ sieve cell เท่านั้น ซึ่งเชื้อมีลักษณะเป็นเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ (cell wall) มีเพียงเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ห่อหุ้มเซลล์เท่านั้น จึงทำให้มีรูปร่างไม่แน่นอนหลายรูปแบบ (pleomorphic หรือ polymorphic cell) ตั้งแต่ลักษณะกลม รี ยาว ลูกปัด จนถึงแยกเป็นเส้นสาย และมีขนาดตั้งแต่ 200-1,000 นาโนเมตร มีลักษณะเป็น obligate parasite อาศัยอยู่เฉพาะในส่วนของเซลล์ท่ออาหารของพืช ไม่สามารถเข้าสู่พืชได้โดยตรง ดังนั้นการถ่ายทอดเชื้อจากต้นหนึ่งไปยังอีกต้นหนึ่งต้องอาศัยพาหะนำไป อีกทั้งการที่เชื้อไม่มีผนังเซลล์จึงไม่สามารถถ่ายทอดได้โดยวิธีกลหรือวิธีการสัมผัส ซึ่งการถ่ายทอดจึงมีด้วยกัน 2 รูปแบบคือ 1.การถ่ายทอดภายในต้นพืช โดยการติดไปกับท่อนพันธุ์ การติดตาต่อกิ่ง และการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด 2.การถ่ายทอดระหว่างต้นพืช โดยการใช้พืชชั้นสูงที่เรียกว่า ฝอยทอง (*Cuscuta* spp.) ในการถ่ายทอดเชื้อ และการถ่ายทอดโดยแมลงพาหะ ได้แก่ เพลี้ยจักจั่น (leafhopper) เพลี้ยกระโดด (planthopper) และเพลี้ยไก่ฟ้า (psyllid) กลุ่มอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาจะแสดงอาการแตกต่างกันไป ส่วนใหญ่มักมีอาการเหลือง และมีอาการเฉพาะอื่นๆ เช่น อาการแตกพุ่มแจ้ อาการแตกพุ่มฝอย และอาการดอกเขียว ซึ่งเชื้อไฟโตพลาสมาชนิดหนึ่งๆ อาจทำให้เกิดอาการหลายอาการ

กรมวิชาการเกษตร

ร่วมกัน การเรียกชื่อโรคโดยส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยชื่อสามัญของพืชและอาการของโรคที่เห็นเด่นชัด (สุภาพร, 2552) ไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคในมะเขือเทศตามที่มีการรายงานไว้ คือ *Candidatus* Phytoplasma aurantifolia โดยก่อให้เกิดโรคที่เรียกกันว่า Tomato big bud ซึ่งลักษณะที่พบได้แก่ อาการใบม้วนขึ้น (upward curling) การชะลูดของกิ่ง (erect nature of branches) อาการยอดหด (short) ลำต้นหนา (thick stem) ใบผิดรูป (deformed leaves) ใบเป็นกระจุก (mass of leaves) ยอดเจริญผิดปกติ (erect shoot) และอาการพุ่มฝอย (bushy) (Pacific Pests and Pathogens, 2016) ซึ่งในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการพบไฟโตพลาสมาชนิดที่ก่อโรคในมะเขือเทศและโรค Tomato big bud ที่เกิดกับมะเขือเทศที่ถูกไฟโตพลาสมาเข้าทำลาย

วิธีการที่ใช้ในการตรวจสอบไฟโตพลาสมาโดยทั่วไปคือ การตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แต่ในปัจจุบันวิธีการที่เป็นที่นิยมอีกวิธีหนึ่งคือ การตรวจสอบไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested PCR ทั้งในวิธีการมาตรฐานสำหรับการตรวจสอบไฟโตพลาสมาของ International Standard for Phytosanitary Measures No.27; Diagnostic Protocols for Regulated Pests (ISPM, 2016) และ European and Mediterranean Plant Protection Organization; PM 7/133 (1) Generic detection of phytoplasmas (EPPO, 2018) โดยที่วิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค nested PCR จะมีความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบมากกว่าการตรวจสอบเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) ธรรมดา เนื่องจากหลักการของเทคนิค nested PCR คือการขยายสัญญาณของยีนเป้าหมายด้วยการทำพีซีอาร์ในรอบที่หนึ่ง (first-stage PCR) ซึ่งจะทำให้ชิ้นของยีนเป้าหมายมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น หลังจากนั้นจึงทำพีซีอาร์ในรอบที่สอง (second-stage PCR) โดยนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ในรอบที่หนึ่งมาเป็นต้นแบบ (template) ในการทำพีซีอาร์ในรอบที่สอง ซึ่งจะทำให้มีชิ้นของยีนเป้าหมายเพิ่มมากขึ้นหากมียีนเป้าหมายในปฏิกิริยาดังกล่าว

งานวิจัยในครั้งนี้ ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีการนำเข้าจากต่างประเทศ ในระหว่างเดือนตุลาคม 2562 – กันยายน 2563 รวมทั้งสิ้นจำนวน 43 รายการ (shipments) นำเข้าจาก 9 ประเทศ ได้แก่ เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากฟิลิปปินส์ (Philippines) จำนวน 3 รายการ นำเข้าจากอินเดีย (India) จำนวน 30 รายการ นำเข้าจากจีน (China) 1 รายการ นำเข้าจากฮ่องกง (Hong Kong) จำนวน 1 รายการ นำเข้าจากอเมริกา (U.S.A.) จำนวน 1 รายการ นำเข้าจากเนเธอร์แลนด์ (Netherlands) จำนวน 1 รายการ นำเข้าจากฝรั่งเศส (France) จำนวน 1 รายการ นำเข้าจากเกาหลีใต้ (Korea) จำนวน 1 รายการ และนำเข้าจากอิสราเอล (Israel) จำนวน 4 รายการ **(ตารางที่ 2)** ลักษณะของเมล็ดมะเขือเทศจากการตรวจดูเบื้องต้นด้วยตาเปล่า พบว่า ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศทั้ง 43 รายการมีลักษณะเมล็ดปกติ บางตัวอย่างมีการเคลือบสารเคมีที่มีสีและบางตัวอย่างมองเห็นเป็นสีเมล็ดปกติ นำเมล็ดที่ได้จากการสุ่มไปทำการเพาะบนกระดาษกรองเพื่อให้ได้ต้นกล้ามะเขือเทศที่อายุประมาณ 7-10 วัน หลังจากนั้นนำต้นกล้ามะเขือเทศมาสกัดสารพันธุกรรม

กรมวิชาการเกษตร

ชนิดดีเอ็นเอ เพื่อนำไปตรวจสอบหาไฟโตพลาสมาที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศดังกล่าวด้วยเทคนิค nested PCR ผลการตรวจสอบพบว่าทั้ง 43 ตัวอย่าง *ไม่พบ*เชื้อไฟโตพลาสมาติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าดังกล่าว **(ตารางที่ 3 และภาพที่ 1)** จากผลการศึกษาในครั้งนี้ให้ผลการตรวจสอบที่ไม่สอดคล้องกับการรายงานของ Calari *et al.* (2011) ซึ่งพบการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดของไฟโตพลาสมาในมะเขือเทศ โดยทำการเก็บรวบรวมเมล็ดพันธุ์จากต้นแม่ที่แสดงอาการและตรวจพบไฟโตพลาสมาจากแหล่งต่างๆ นำมาเพาะจนได้ต้นกล้า จากนั้นจึงทำการสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบเชื้อไฟโพลาสมาด้วยเทคนิค nested PCR และจัดจำแนกเชื้อด้วยเทคนิค RFLP หรือส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งความไม่สอดคล้องของผลการศึกษาที่เกิดขึ้นอาจเป็นเพราะ 1.เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศดังกล่าวเป็นเมล็ดพันธุ์สะอาดปลอดจากไฟโตพลาสมา จึงทำให้ตรวจไม่พบ 2.เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศดังกล่าวผ่านกระบวนการในการทำความสะอาดและทำแห้งเมล็ดตามกระบวนการผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการค้า จึงทำให้ไฟโตพลาสมาที่ติดอยู่กับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศถูกกำจัดหรือถูกทำลายไป

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

จากการสุ่มตัวอย่างและตรวจหาไฟโตพลาสมาในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีการนำเข้าจากต่างประเทศในช่วงปี 2562 - 2563 (ตุลาคม 2562 - กันยายน 2563) จำนวน 43 ตัวอย่าง นำเข้าจาก 9 ประเทศดังกล่าว *ไม่พบ*ไฟโตพลาสมาติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเหล่านั้น แม้ว่าการวิจัยในครั้งนี้จะบ่งชี้ว่าไม่มีไฟโตพลาสมาติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีการนำเข้าจากทั้ง 9 ประเทศ ก็ไม่ได้หมายความว่าจะไม่มีศัตรูพืชชนิดนี้ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่จะมีการนำเข้ามาจากต่างประเทศอีกในอนาคต ดังนั้น ผู้วิจัยมีความคิดเห็นว่าศัตรูพืชชนิดนี้ ที่เรียกว่า “ไฟโตพลาสมา” แม้จะยังไม่มีการยืนยันว่าสามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ และยังไม่มีรายงานการพบศัตรูพืชชนิดนี้เข้าทำลายมะเขือเทศในประเทศไทย เจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชชนิดใหม่เข้ามาในประเทศไทยก็ควรที่จะมีการตรวจสอบไฟโตพลาสมาในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีการนำเข้าจากต่างประเทศเป็นประจำอย่างต่อเนื่องต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

11. เอกสารอ้างอิง :

สุภาพร กลิ่นคง. 2552. ไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 118 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร

Calari, A., Paltrinieri, S., Contaldo, N., Sakalieva, D., Mori, N., Duduk, B., and Bertaccini, A. 2011. Molecular evidence of phytoplasmas in winter oilseed rape, tomato and corn seedlings. Bulletin of Insectology. 64: S157-S158.

Deng, S. & Hiruki, C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14: 53–61.

EPPO. 2018. European and Mediterranean Plant Protection Organization. EPPO Bulletin. PM 7/133 (1) Generic detection of phytoplasmas. 48 (3): 414–424.

Gundersen, D.E. & Lee, I-M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35: 144–151.

International Standard for Phytosanitary Measures 27 (ISPM 27). 2016. International Plant Protection Convention. DP 12: Phytoplasmas.

Lee, I.-M., Hammond, R.W., Davis, R.E. & Gundersen, D.E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 83: 834–842.

Pacific Pests and Pathogens. 2016. Pacific Pests and Pathogens Fact Sheet. Tomato big bud (212). Copyright© 2016.

Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C.D. & Kirkpatrick, B.C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma like organisms or phytoplasmas. *In* S. Razin & J.G. Tully, eds. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology*, Vol. 1, pp. 369–380. San Diego, CA, Academic Press. 483 pp.

Werren, J.H., Windsor, D. & Guo, L. 1995. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 262: 197–204.

กรมวิชาการเกษตร

12. ภาคผนวก

สารละลาย General Extraction Buffer; 1X GEB

GEB powder (agdia®)	จำนวน	16.5	กรัม
Tween-20	จำนวน	10	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ครบ 500 มิลลิลิตร

ตารางที่ 1 คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested PCR (ISPM 27, 2016)

Primer set	Nucleotide (5'---> 3')	Target gene	Amplicon size (bp)
P1 / P7	P1: AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T (Deng and Hiruki, 1991) P7: CGT CCT TCA TCG GCT CTT (Schneider *et al*., 1995)	16S/23S	1,800 bp
R16F2n / R16R2	R16F2n: GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG (Gundersen and Lee, 1996) R16R2: TGA CGG GCC GTG TGT ACA AAC CCC G (Lee *et al*., 1993)	16S/IS	1,250 bp

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 ข้อมูลเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากต่างประเทศที่ทำการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมา

ลำดับที่	วันที่	บริษัทผู้นำเข้า	แหล่งกำเนิด	น้ำหนัก
1	3 ม.ค. 62	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	Philippines	200.00 กก.
2	14 ม.ค. 62	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	India	12.89 กก.
3	16 ม.ค. 62	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	India	14.08 กก.
4	17 ม.ค. 62	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	India	104.50 กก.
5	21 ม.ค. 62	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	India	25.65 กก.
6	4 ก.พ. 62	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	Philippines	378.20 กก.
7	9 ก.พ. 62	บ.นามดารี สยาม ซีด	India	40.00 กก.
8	11 มี.ค. 62	บ.เจียไต๋ ซีด	China	28.83 กก.
9	11 มี.ค. 62	บ.ฮฮทิ-โกร	Hong Kong	350.118 กก.
10	2 เม.ย. 62	บ.ไดนามิค ซีด	India	15.00 กก.
11	10 เม.ย. 62	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	India	20.27 กก.
12	23 เม.ย. 62	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	India	21.47 กก.
13	23 เม.ย. 62	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	Philippines	20.55 กก.
14	8 พ.ค. 62	บ.มอนซานโต้	India	28.39 กก.
15	14 พ.ค. 62	บ.มอนซานโต้	India	77.14 กก.
16	18 พ.ค. 62	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	India	151.40 กก.
17	24 พ.ค. 62	บ.มอนซานโต้	India	15.04 กก.
18	30 พ.ค. 62	บ.นามดาห์รี	India	407.90 กก.
19	4 มิ.ย. 62	บ.มอนซานโต้	India	23.90 กก.
20	8 มิ.ย. 62	บ.มอนซานโต้	India	129.49 กก.
21	8 มิ.ย. 62	บ.มอนซานโต้	India	149.90 กก.
22	12 มิ.ย. 62	บ.ซินเจนทา	India	50.00 กก.
23	12 ก.ค. 62	บ.มอนซานโต้	India	10.69 กก.
24	13 ก.ค. 62	บ.มอนซานโต้	India	57.53 กก.
25	13 ก.ค. 62	บ.มอนซานโต้	India	25.96 กก.
26	2 ส.ค. 62	บ.เอช เอ็ม โคลส	India	24.55 กก.

กรมวิชาการเกษตร

27	18 ส.ค. 62	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	U.S.A.	9.346 กก.
28	20 ส.ค. 62	บ.ฟิลเลอร์ ซีด	Netherland	100.00 กก.
29	17 ก.พ. 63	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	India	144.706 กก.
30	9 มี.ค. 63	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	France	2.498 กก.
31	10 เม.ย. 63	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	Korea	15.35 กก.
32	14 เม.ย. 63	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	India	409.25 กก.
33	11 มิ.ย. 63	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	India	92.00 กก.
34	15 มิ.ย. 63	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	India	100.50 กก.
35	3 ก.ค. 63	บ.นามดาห์รี สยาม ซีดส์	India	20.80 กก.
36	9 ก.ค. 63	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	India	17.90 กก.
37	4 ส.ค. 63	บ.ไทยโกลเด้นซีด	Israel	0.19 กก.
38	21 ส.ค. 63	บ.เอ.จี.ยูนิเวอร์แซล	Israel	0.126 กก.
39	14 ก.ย. 63	บ.เพื่อนเกษตรกร	Israel	0.82 กก.
40	15 ก.ย. 63	บ.ซีน เมล็ดพันธุ์	Israel	246.44 กก.
41	9 ต.ค. 63	บ.มาหยา ซีดส์	India	26.00 กก.
42	29 ต.ค. 63	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	India	375.60 กก.
43	24 พ.ย. 63	บ.นามดาห์รี สยาม ซีดส์	India	10.00 กก.

กรมวิชาการเกษตร

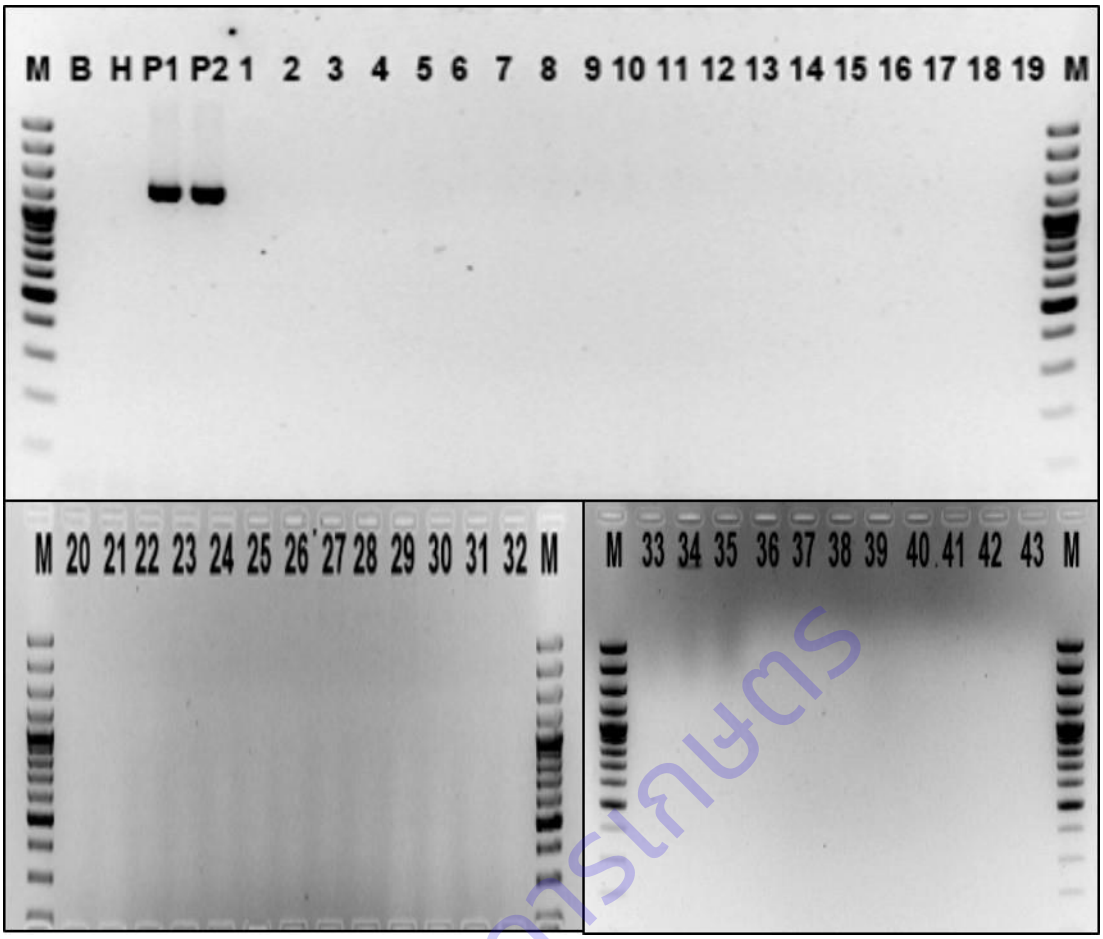
ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบไฟโตพลาสมาในตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากต่างประเทศ

ลำดับที่	บริษัทผู้นำเข้า	แหล่งกำเนิด	ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค nested PCR
1	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	Philippines	ไม่พบ
2	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	India	ไม่พบ
3	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	India	ไม่พบ
4	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	India	ไม่พบ
5	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	India	ไม่พบ
6	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	Philippines	ไม่พบ
7	บ.นามดารี สยาม ซีด	India	ไม่พบ
8	บ.เจียไต๋ ซีด	China	ไม่พบ
9	บ.ฮอทิ-โกร	Hong Kong	ไม่พบ
10	บ.ไดนามิค ซีด	India	ไม่พบ
11	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	India	ไม่พบ
12	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	India	ไม่พบ
13	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	Philippines	ไม่พบ
14	บ.มอนซานโต้	India	ไม่พบ
15	บ.มอนซานโต้	India	ไม่พบ
16	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	India	ไม่พบ
17	บ.มอนซานโต้	India	ไม่พบ
18	บ.นามดาห์รี	India	ไม่พบ
19	บ.มอนซานโต้	India	ไม่พบ
20	บ.มอนซานโต้	India	ไม่พบ
21	บ.มอนซานโต้	India	ไม่พบ
22	บ.ซินเจนทา	India	ไม่พบ
23	บ.มอนซานโต้	India	ไม่พบ
24	บ.มอนซานโต้	India	ไม่พบ
25	บ.มอนซานโต้	India	ไม่พบ
26	บ.เอช เอ็ม โคลส	India	ไม่พบ

กรมวิชาการเกษตร

27	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	U.S.A.	ไม่พบ
28	บ.ฟิลเลอร์ ซีด	Netherland	ไม่พบ
29	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	India	ไม่พบ
30	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	France	ไม่พบ
31	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	Korea	ไม่พบ
32	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	India	ไม่พบ
33	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	India	ไม่พบ
34	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	India	ไม่พบ
35	บ.นามดาห์รี สยาม ซีดส์	India	ไม่พบ
36	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	India	ไม่พบ
37	บ.ไทยโกลเด้นซีด	Israel	ไม่พบ
38	บ.เอ.จี.ยูนิเวอร์แซล	Israel	ไม่พบ
39	บ.เพื่อนเกษตรกร	Israel	ไม่พบ
40	บ.ซีน เมล็ดพันธุ์	Israel	ไม่พบ
41	บ.มาหยา ซีดส์	India	ไม่พบ
42	บ.อีสท์ เวสท์ ซีด	India	ไม่พบ
43	บ.นามดาห์รี สยาม ซีดส์	India	ไม่พบ

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1 ผลการตรวจสอบแถบแบนของดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis ของการตรวจหาไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested PCR โดย M คือ 100 bp Plus DNA Ladder, P1 และ P2 คือ positive control; ดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย และหมายเลข 1 - 43 คือ ตัวอย่างมะเขือเทศที่นำมาตรวจสอบ

กรมวิชาการเกษตร